

## INSUFICIENCIA CARDÍACA

# Hipotiroidismo y daño miocárdico en donantes cardíacos

José López Haldón<sup>a</sup>, Ángel Martínez Martínez<sup>a</sup>, Antonio Ordóñez<sup>b</sup>,  
Julio Marqués<sup>c</sup>, José Miguel Borrego<sup>b</sup> y José Luis Serrera<sup>c</sup>

Servicios de <sup>a</sup>Cardiología, <sup>b</sup>Cirugía Cardiovascular y <sup>c</sup>Bioquímica. Hospital San Sebastián. Écija.  
Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla.

**Introducción y objetivos.** La muerte cerebral es capaz de provocar disfunción contráctil del miocardio e hipotiroidismo. Dicha disfunción miocárdica es un factor limitante al considerar el corazón del donante para trasplante. Se ha demostrado que el daño miocárdico es el mecanismo a través del cual se establece la disfunción contráctil en los donantes. Por otro lado, se ha invocado al hipotiroidismo como un factor causal primordial en las alteraciones cardiovasculares que acontecen en los sujetos en muerte cerebral. No se conoce si existe alguna relación entre este hipotiroidismo y el daño miocárdico que aparecen en la muerte cerebral. En este estudio cuantificamos el daño miocárdico y el estado hormonal tiroideo en un grupo de donantes y analizamos si existe una relación entre hipotiroidismo y el daño del músculo cardíaco.

**Pacientes y método.** En el suero de 45 donantes se cuantificaron troponinas T e I como marcadores de daño miocárdico, así como hormonas tiroideas. Se analizó la correlación entre las troponinas y el estado tiroideo.

**Resultados.** Una o ambas troponinas estaban elevadas en 19 donantes (42,2%). El hipotiroidismo fue muy frecuente, ya que estuvo presente en 39 donantes (86,7%). No hubo correlación alguna entre ninguna de las troponinas y las concentraciones de triyodotironina.

**Conclusiones.** El hipotiroidismo y el daño miocárdico son frecuentes en los donantes en muerte cerebral, sin que exista asociación alguna entre ambas alteraciones.

**Palabras clave:** *Trasplante cardíaco. Troponina. Hipotiroidismo. Donantes de tejidos.*

(*Rev Esp Cardiol* 2001; 54: 735-740)

## Hypothyroidism and Myocardial Damage in Cardiac Donors

**Background and objectives.** Brain death may induce myocardial contractile dysfunction and hypothyroidism. This myocardial dysfunction is a limiting factor when considering donor heart for transplantation. Myocardial damage has shown to be the mechanism in which contractile dysfunction is established in donors. On the other hand, hypothyroidism has been evoked as a major cause of cardiovascular disorders in brain dead subjects. It is not known whether any relationship exists between hypothyroidism and myocardial damage that appear in brain death. In this study myocardial damage and thyroid status are quantified in a donor population, and whether a correlation between hypothyroidism and myocardial damage exists is analyzed.

**Patients and method.** Serum samples from 45 cardiac donors were examined for cardiac troponins T and I as myocardial damage markers, as well as thyroid hormones. Correlations between cardiac troponins and thyroid hormones were assessed.

**Results.** One or both cardiac troponins were elevated in 19 donors (42.2%). Hypothyroidism was a very frequent finding, since it was present in 39 donors (86.7%). No correlation was observed between any of the myocardial damage markers and triiodothyronine levels.

**Conclusions.** Hypothyroidism and myocardial damage are common in brain dead donors. No association exists between both disorders.

**Key words:** *Transplantation. Troponin. Hypothyroidism. Tissue donors.*

(*Rev Esp Cardiol* 2001; 54: 735-740)

## INTRODUCCIÓN

La muerte cerebral provoca una serie de alteraciones extracraneales. Entre ellas se ha observado que una proporción significativa de potenciales donantes pre-

sentan disfunción sistólica ventricular que, cuando es severa, conduce a la no consideración del corazón para el trasplante. El rechazo de estos candidatos a donación hace aún mayor el principal problema que hoy día existe en el trasplante cardíaco: la escasez de donantes. Riou et al<sup>1</sup> demostraron que el camino a través del cual se establece la disfunción sistólica del donante es el daño miocárdico. Más aún, el daño miocárdico «menor», que no es capaz de afectar significativamente a la función sistólica y, por tanto, no conduce al rechazo de la víscera para su trasplante, parece que puede aumentar el riesgo de fallo precoz del injerto en el

Correspondencia: Dr. J. López Haldón.  
Servicio de Cardiología. Hospital San Sebastián.  
Sor Cándida Saiz, 1. 41400 Écija. Sevilla.  
Correo electrónico: lhaldon@interbook.net.

Recibido el 24 de octubre del 2000.  
Aceptado para su publicación el 27 de diciembre del 2001.

TABLA 1. Causas de muerte cerebral, requerimientos de dopamina, concentraciones de troponinas y hormonas tiroideas en los 45 donantes

Donante	Causa de la muerte	Dopamina ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ )	CK (U/l)	CK-MB (ng/ml)	TnT (ng/ml)	TnI (ng/ml)	TSH (mU/l)	T <sub>4</sub> libre (ng/l)	T <sub>3</sub> libre ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )
1	TC	0	267	26	0,08	6,08	0,11	0,33	0,58
2	HIC	3	195	6	0	1,64	0,56	0,94	0,32
3	TC	10	428	22	0,26	3,03	0,41	1,28	0,1
4	HIC	0	63	26	0,22	4,04	0,84	1,05	0,91
5	HIC	5	44	4	0,06	2,12	1,81	1,16	1,34
6	TC	0	67	3	0,01	1,09	0,5	0,7	1,03
7	HIC	3	184	3	0	1,05	3,11	0,97	1,5
8	TC	10	1.013	36	0,03	< 0,5	0,68	0,63	0,94
9	TC	5	87	2	0,18	< 0,5	0,37	1,23	0,84
10	TC	10	83	3	0,10	2,70	3,19	0,68	1,23
11	TC	0	241	8	0,01	0,88	6,5	0,98	1,99
12	TC	10	499	44	0,64	11,3	0,32	1,5	0,26
13	TC	0	1.876	37	0,28	1,63	0,32	0,57	0,18
14	HIC	4	257	30	1,15	17,7	0,17	1,04	1,79
15	TC	8	2.124	47	0,51	3,61	0,21	1,52	0,1
16	HIC	0	100	2	0,01	1,67	0,72	0,45	0,65
17	TC	0	185	28	0,33	5,13	0,2	0,85	1,13
18	HIC	0	373	4	0	< 0,5	2,43	0,74	0,65
19	HIC	9	126	27	0,45	3	0,1	0,52	1,24
20	HIC	8	180	29	0,3	3,39	7,59	1,71	0,84
21	TC	0	861	7	0,25	4,98	1,71	1,11	0,58
22	TC	5	908	47	0,02	< 0,5	2,08	0,53	1,84
23	TC	4	289	12	0,11	1,29	0,89	1,25	0,8
24	TC	0	222	4	0,03	< 0,5	0,33	1,38	0,42
25	HIC	0	34	1	0	< 0,5	0,2	0,71	0,69
26	TC	5	24	1	0	0,67	0,2	1	0,67
27	TC	8	512	12	0,26	1,6	0,85	0,83	0,95
28	TC	4	480	18	0,11	0,94	0,41	1,36	1,19
29	TC	0	232	7	0,18	4,82	0,7	1,31	0,3
30	TC	8	938	80	0,09	0,93	0,67	1,15	0,71
31	TC	0	1.079	9	1,43	0,6	1,86	0,84	1,87
32	HIC	10	118	25	0,14	1,46	0,82	0,64	0,67
33	HIC	6	59	5	0,02	4,82	0,09	1,04	1,19
34	TC	10	439	18	0,48	3,16	0,87	1,4	0,53
35	TC	12	2.636	82	0,51	1,74	2,48	0,77	1,3
36	HIC	4	82	3	0,01	< 0,5	0,14	0,44	1,26
37	TC	10	1.911	38	0,16	1,29	0,77	0,77	0,56
38	TC	4	128	9	0,14	1,64	0,44	0,73	0,19
39	TC	5	787	5	0,32	1,09	1,73	0,7	0,79
40	A	4	165	6	0,03	< 0,5	0,19	1,41	0,35
41	TC	10	197	3	0	< 0,5	0,12	1,52	0,55
42	TC	6	284	15	0,18	1,29	0,29	0,62	0,88
43	TC	8	985	30	0,03	< 0,5	0,78	0,2	1,69
44	TC	6	1.127	14	0,06	< 0,5	2,63	1,56	0,86
45	A	4	248	4	0,03	5	0,68	1,25	0,1

TC: traumatismo craneal; HIC: hemorragia intracraneal; A: ahogamiento; CK: creatinina.

receptor<sup>2</sup>. La causa de ese daño miocárdico inducido por la muerte cerebral no es aún bien conocida.

El hipotiroidismo es un hallazgo frecuente en los sujetos en muerte cerebral<sup>3</sup>. El perfil más común es el llamado síndrome de la enfermedad eutiroida. Este término refleja que el defecto está en la conversión periférica de T<sub>4</sub> a T<sub>3</sub>. Algunos investigadores han concluido que este hipotiroidismo es el causante de las alteraciones cardiovasculares que aparecen en los donantes<sup>4-6</sup>. Este estudio fue diseñado para analizar la

correlación entre el daño miocárdico y el déficit tiroideo en donantes cardíacos. Para cuantificar el daño miocárdico utilizamos TnT y TnI, basados en su elevada especificidad y sensibilidad para este fin<sup>7,8</sup>.

## PACIENTES Y MÉTODO

De un total de 49 trasplantes consecutivos realizados en el Hospital Virgen del Rocío se consideraron 45 donantes. Los 4 casos restantes fueron excluidos por la

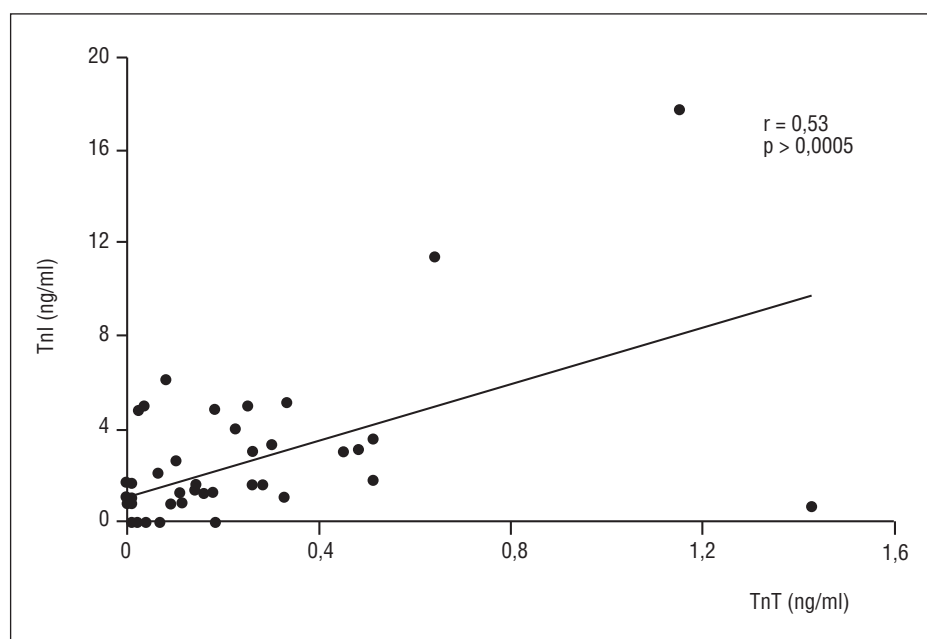


Fig. 1. Correlación entre los valores de TnT y TnI. TnT: troponina T; TnI: troponina I.

falta de disponibilidad de suero del donante. Veinticinco de los 45 donantes (58%) eran varones. La edad media era  $29 \pm 9,3$  años (rango: 10-49 años). Las causas de muerte cerebral fueron traumatismo craneal en 30 casos (66,7%), hemorragia intracraneal en 13 casos (28,9%) y ahogamiento en 2 (4,4%). Hubo 32 donantes (71,1%) que precisaron de apoyo inotrópico con dopamina, aunque sólo uno de ellos requirió una dosis superior a  $10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ . La sangre de los donantes fue extraída en tubos con activador del coágulo justo antes de la cardiectomía y trasladada a nuestro hospital por el equipo extractor junto con la víscera. Una vez en nuestro centro, las muestras eran centrifugadas para la obtención del suero, el cual se congelaba a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su procesamiento. Se usó la técnica de enzimmunoanálisis para cuantificar tanto la TnT (Elecsys, Boehringer Mannheim), como la TnI (Opus, Behring). Los puntos de corte fueron considerados  $0,2 \text{ ng/ml}$  para la TnT y  $3,1 \text{ ng/ml}$  para la TnI, según publicaciones previas<sup>7,8</sup>. Para comparar las troponinas con marcadores clásicos de daño miocárdico se midieron tanto la creatinina (CK) total como su fracción CK-MB. La TSH,  $T_4$  libre y  $T_3$  libre se analizaron por método inmunoradiométrico (CIS Bio International para la TSH, y DPC para la  $T_4$  y la  $T_3$ ). Los rangos de normalidad para la TSH,  $T_4$  libre, y  $T_3$  libre fueron  $0,12-5 \text{ mU/l}$ ,  $1,5-5 \text{ ng/l}$  y  $0,7-2,2 \mu\text{g/l}$ , respectivamente. La comparación cuantitativa de variables se realizó por medio del test de la *t* de Student y las correlaciones a través de la *r* de Pearson.

## RESULTADOS

En la tabla 1 se exponen los valores de los marcadores de daño miocárdico y el perfil tiroideo junto con la

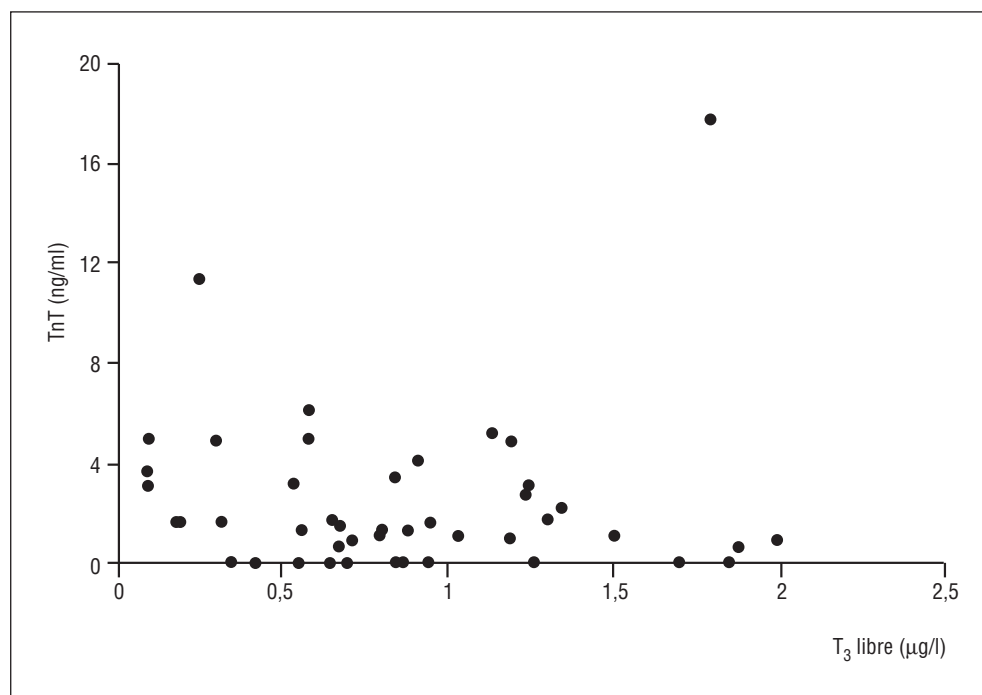
TABLA 2. Comparación de cada marcador de daño miocárdico entre los donantes fallecidos de traumatismo y el resto

	TC (n = 30)	Otras causas (n = 15)	p
CK (U/l)	$697 \pm 674,1$	$148,5 \pm 94,23$	0,00013
CK-MB (ng/ml)	$22,2 \pm 21,5$	$11,7 \pm 11,6$	0,038
TnT (ng/ml)	$0,23 \pm 0,28$	$0,16 \pm 0,30$	0,48
TnI (ng/ml)	$2,17 \pm 2,36$	$3,19 \pm 4,31$	0,40

TC: traumatismo craneal; CK: creatinina; CK-MB: fracción *muscle-brain* de la creatinina; TnT: troponina T; TnI: troponina I.

causa de la muerte cerebral y los requerimientos de dopamina en cada uno de los 45 donantes. Hubo 15 donantes (33,3%) que presentaron elevación de la TnT ( $0,49 \pm 0,35 \text{ ng/ml}$ , rango:  $0,22-1,43 \text{ ng/ml}$ ) y 12 casos (27,7%) con elevación de la TnI ( $6,17 \pm 4,21 \text{ ng/ml}$ , rango:  $3,16-17,7 \text{ ng/ml}$ ). Ocho donantes presentaron elevación de ambas troponinas, siete sólo de la TnT y cuatro sólo de la TnI. Se observó una correlación significativa, aunque no intensa (fig. 1), entre los valores de TnT y de TnI ( $r = 0,53$ ,  $p > 0,0005$ ). La presencia de hipotiroidismo, diagnosticado sobre la base a una  $T_3$  libre disminuida, estuvo presente en 39 donantes (86,7%, media:  $0,71 \pm 0,37 \mu\text{g/l}$ , rango:  $0,1-1,34 \mu\text{g/l}$ ). Veintinueve de los 39 donantes hipotiroideos (74,4%) presentaron el perfil de síndrome de la enfermedad eutiroidea ( $T_3$  libre reducida, TSH y  $T_4$  libre normales).

Como se aprecia en las figuras 2 y 3, no se observó ninguna correlación entre las concentraciones de  $T_3$  libre y TnT ( $r = 0,23$ ,  $p = \text{NS}$ ) o TnI ( $r = 0,05$ ,  $p = \text{NS}$ ). Para asegurar la especificidad de las troponinas como marcadores de daño miocárdico se compararon en dos grupos de donantes: aquellos fallecidos por un trauma-



**Fig. 2.** Ausencia de correlación entre las concentraciones de  $T_3$  libre y las de TnT.  $T_3$ : triyodotironina; TnT: troponina T.

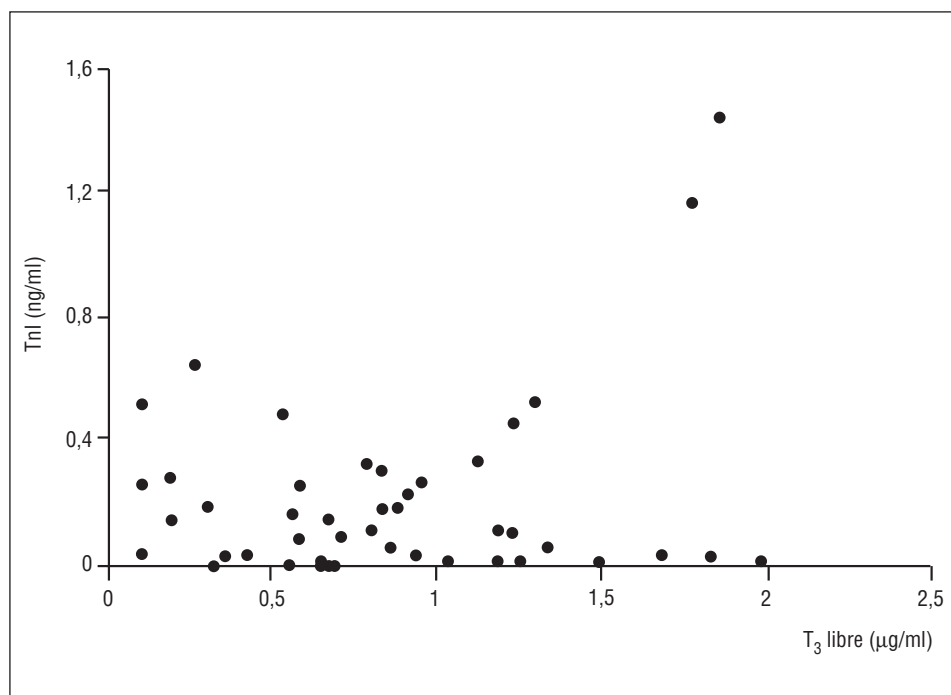
tismo, donde suele existir gran componente añadido de daño muscular esquelético, y los fallecidos por otras causas (tabla 2). No se apreciaron diferencias en los valores de TnT y TnI en ambos grupos. Sin embargo, sí las hubo en los valores de CK y CK-MB, ambos significativamente mayores en el grupo de muerte cerebral por traumatismo. Finalmente, no se apreció correlación alguna entre la dosis de dopamina requerida y las concentraciones de  $T_3$  libre ( $r = -0,05$ ,  $p = NS$ ), TnT ( $r = 0,08$ ,  $p = NS$ ) y TnI ( $r = 0$ ,  $p = NS$ ).

## DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio demuestran que no existe relación entre el daño miocárdico y el hipotiroidismo que acontecen en los donantes en situación de muerte cerebral. El hipotiroidismo es una alteración que afecta a la gran mayoría de los donantes en muerte cerebral. Un 86,7% de los donantes de nuestra serie tuvieron esta alteración, cifra que concuerda con los otros estudios<sup>3</sup>. Las tres cuartas partes de los donantes hipotiroideos de nuestra serie presentaban el perfil del síndrome de la enfermedad eutiroidea. Novitzky et al<sup>4</sup> publicaron que la muerte cerebral supone un cambio de un metabolismo aeróbico a anaeróbico, y que la administración de  $T_3$  normaliza esta alteración metabólica y mejora la función cardíaca. También otros autores han comunicado una mejoría en la función cardíaca tras la administración de hormona tiroidea, tanto en el campo experimental<sup>5</sup> como en el clínico<sup>6</sup>. Basados en estos datos, el tratamiento hormonal sustitutivo de los donantes con  $T_3$  ha sido recomendado por estos investigadores<sup>9</sup>.

Al igual que el hipotiroidismo, el daño miocárdico, cuantificado mediante la determinación de troponinas, es también un hallazgo frecuente entre los donantes, de forma que en nuestra serie 19 de los 45 donantes (42,2%) presentaron al menos una troponina elevada. Riou et al<sup>1</sup> cuantificaron las concentraciones de TnT en 100 potenciales donantes cardíacos y las relacionaron con la función sistólica ventricular izquierda calculada por ecocardiograma transesofágico, una vez normalizadas las condiciones de carga ventricular. Los autores apreciaron que todos los sujetos con disfunción ventricular tenían evidencia de daño miocárdico. Esta relación no sólo fue cualitativa, sino también cuantitativa, de forma que a mayor elevación de TnT mayor era la depresión de la función sistólica. Por tanto, aunque pudieran existir otros mecanismos, parece que es el daño miocárdico, cuantificado por medio de marcadores como las troponinas, la vía principal por la que se establece la disfunción del músculo cardíaco en donantes.

Según esto, y dada la ausencia de relación entre hipotiroidismo y daño miocárdico observada en nuestro estudio, las alteraciones tiroideas no deben ser la causa primordial de la depresión miocárdica que acontece en la muerte cerebral. De hecho, varios ensayos controlados y aleatorizados han demostrado que no existe un beneficio en tratar con  $T_3$  a los donantes<sup>10,11</sup>. Goarin et al<sup>10</sup> no objetivaron mejoría alguna en los parámetros hemodinámicos o en diversos índices sistólicos y volumétricos del ventrículo izquierdo, al comparar el tratamiento con  $T_3$  frente a placebo. Esta ausencia de beneficio ocurrió a pesar de la normalización de las concentraciones plasmáticas de  $T_3$  en el grupo tratado. Randell et al<sup>11</sup> comunicaron resultados similares.



**Fig. 3.** Ausencia de correlación entre las concentraciones de  $T_3$  libre y las de TnI.  $T_3$ : triyodotironina; TnI: troponina I.

Nuestro trabajo es el primero en investigar desde un punto de vista bioquímico la posible asociación entre el hipotiroidismo y el daño miocárdico en los donantes. El hallazgo de la ausencia de relación entre ambos contrasta con los resultados del estudio de Montero et al<sup>12</sup>. Estos autores incluyeron a 21 donantes potenciales y analizaron el estado tiroideo cuantificando en biopsias miocárdicas los receptores nucleares de  $T_3$  ocupados. El daño miocárdico fue también medido en las biopsias y categóricamente dividido en ligero o severo. El daño ligero se acompañaba de un descenso relativo de receptores  $T_3$  ocupados y el daño severo de una ausencia casi completa de receptores ocupados. Dados estos resultados concluyeron afirmativamente sobre una relación entre hipotiroidismo y daño miocárdico en donantes. Probablemente el desacuerdo entre los resultados de Montero et al<sup>12</sup> y nuestro estudio sea debido a razones metodológicas. La biopsia endomiocárdica no es un método adecuado para detectar y cuantificar el daño miocárdico. La biopsia ha demostrado una baja rentabilidad diagnóstica en otras situaciones donde también existe daño miocárdico, como la miocarditis<sup>13</sup>. Esto puede ser debido a que la afección miocárdica no es uniforme y homogénea, sino parcheada. Este tipo de patrón está también presente en el daño miocárdico que se establece en la muerte cerebral<sup>14</sup>. La mediación de troponinas cardíacas probablemente sea un parámetro más fiel que la biopsia a la hora de reflejar el daño miocárdico global.

La ausencia de correlación entre los requerimientos de dopamina y las concentraciones, no sólo de  $T_3$ , sino también de troponinas, no es un argumento en contra

del papel protagonista del daño miocárdico en la disfunción cardíaca contráctil del donante. Esto es explicable por el hecho de que la hipotensión del donante, la cual conduce al uso de inotropos, no es buen índice de la contractilidad ventricular izquierda, sino que está influida por otros muchos factores como la hipovolemia secundaria a la diabetes insípida, la vasodilatación producida por el calentamiento al que se somete el donante, etc.

## CONCLUSIONES

El daño miocárdico y el hipotiroidismo son hallazgos comunes en los donantes, sin que exista una relación entre ambos. Aunque pudieran existir otros mecanismos, parece que es el daño miocárdico, cuantificado por medio de marcadores como las troponinas, la vía principal para el establecimiento de la disfunción del músculo cardíaco en donantes<sup>1</sup>. Según ello, las alteraciones tiroideas no deben ser la causa primordial de la depresión miocárdica que acontece en la muerte cerebral. Algunos estudios apuntan a que es la liberación de catecolaminas la causante de la afección miocárdica<sup>14</sup>. Creemos que es necesario un gran esfuerzo investigador en este campo. Si se consiguiera evitar este daño miocárdico se incrementaría la reserva de donantes, dado que estaríamos obviando la disfunción del corazón del sujeto en muerte cerebral. Pero, además, si la asociación entre daño miocárdico «menor» en el donante y disfunción precoz del injerto en el receptor se confirma<sup>2</sup>, conseguiríamos evitar o al menos mitigar la mayor causa de mortalidad en el primer mes tras el trasplante<sup>15,16</sup>.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Riou B, Dreux S, Roche S, Arthaud M, Goarin JP, Leger P et al. Circulating cardiac troponin T in potential heart transplant donors. *Circulation* 1995; 92: 409-414.
2. Grant JW, Canter CE, Spray TL, Landt Y, Saffitz JE, Ladenson JH et al. Elevated donor cardiac troponin I. A marker of acute graft failure in infant heart recipients. *Circulation* 1994; 90: 2618-2621.
3. Colpart JJ, Ramella S, Bret M, Coronel B, Dorez D, Mercatello A et al. Hypophysis-thyroid axis disturbances in human brain-dead donors. *Transplant Proc* 1996; 28: 171-172.
4. Novitzky D, Cooper DKC, Morrell D, Isaacs S. Change from aerobic to anaerobic metabolism after brain death, and reversal following triiodothyronine therapy. *Transplantation* 1988; 45: 32-36.
5. Votapka TV, Canvasser DA, Pennington DG, Koga M, Swartz MT. Effect of triiodothyronine on graft function in a model of heart transplantation. *Ann Thorac Surg* 1996; 62: 78-82.
6. Jeevanandam V, Todd B, Regillo T, Hellman S, Eldridge C, McClurken J. Reversal of donor myocardial dysfunction by triiodothyronine replacement therapy. *J Heart Lung Transplant* 1994; 13: 685-687.
7. Hamm CW, Ravkilde J, Gerhardt W, Jorgensen P, Peheim E, Ljungdahl L et al. The prognostic value of serum troponin T in unstable angina. *N Engl J Med* 1992; 327: 146-150.
8. Adams JE III, Bodor GS, Davila-Roman VG, Delmez JA, Apple FS, Ladenson JH et al. Cardiac troponin I: a marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation* 1993; 88: 101-106.
9. Novitzky D, Cooper DKC, Human PA, Reichart B, Zuhdi N. Triiodothyronine therapy for heart donor and recipient. *J Heart Transplant* 1988; 7: 370-376.
10. Goarin JP, Cohen S, Riou B, Jacquens Y, Guesde R, Le Bret F et al. The effects of triiodothyronine on hemodynamic status and cardiac function in potential heart donors. *Anesth Analg* 1996; 83: 41-47.
11. Randell TT, Höckerstedt KAV. Triiodothyronine treatment is not indicated in brain-dead multiorgan donors: a controlled study. *Transplant Proc* 1993; 25: 1552-1553.
12. Montero JA, Mallol J, Álvarez F, Benito P, Concha M, Blanco A. Biochemical hypothyroidism and myocardial damage in organ donors: are they related? *Transplant Proc* 1988; 20: 746-748.
13. Mason JW. Endomyocardial biopsy: the balance of success and failure. *Circulation* 1985; 71: 185-188.
14. Shivalkar B, Van Loon J, Wieland W, Tjandra-Maga TB, Flameng W. Variable effects of explosive or gradual increase of intracranial pressure on myocardial structure and function. *Circulation* 1993; 87: 230-239.
15. Hosepund JD, Bennett LE, Keck BM, Fiol B, Boucek MM, Novick RJ. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: sixteenth official report-1999. *J Heart Lung Transplant* 1999; 18: 611-626.
16. Almenar Bonet L. The Registry of Spanish Heart Transplantation. Eleventh Official Report (1984-1999). *Rev Esp Cardiol* 2000; 1639-1645.